TaKaRa

QuickPrimer 結果判定用 エクセルシート

（Thermal Cycler Dice® Real Time System 専用）

説明書

v201003

QuickPrimer 結果判定用エクセルシート（Thermal Cycler Dice® Real Time System 専用）は、QuickPrimer (Real Time) シリーズ 病原因子遺伝子検出用（製品コード MR101 ～ MR107、MR109 ～ MR113）および細菌遺伝子（16S rDNA）検出用（製品コード MR201 ～ MR205、MR207、MR208）で得られたデータを解析するためのツールです。Thermal Cycler Dice® Real Time System（タカラバイオ）により得られた Tm 値をトランスポートすることで、判定基準 Tm 値に一致するかどうかを自動表示します。

＊ QuickPrimer 結果判定用エクセルシートは、Microsoft® Office Excel® で作成されたマクロを含むファイルです。このファイルは、以下のバージョンのオペレーションシステム（OS）および Microsoft® Office Excel® で正常に動作することを確認しています。
Windows® XP Operating system
Microsoft® Office Excel® 2003
Microsoft® Office Excel® 2007

＊ 本解析ツールは、タカラバイオウェブサイトからダウンロードしてご利用ください。
http//www.takara-bio.co.jp/

最終結果については、Thermal Cycler Dice® Real Time System の “Result/Analysis” データ解析画面より、サンプルの増幅曲線と融解曲線の波形が陽性コントロール DNA（10 倍希釈液）の増幅曲線、融解曲線の波形と一致するかどうかを確認した上で、総合的な判定を行ってください。詳しい判定方法については取扱説明書をご参照ください。

I. Ct 値および Tm 値の算出と出力

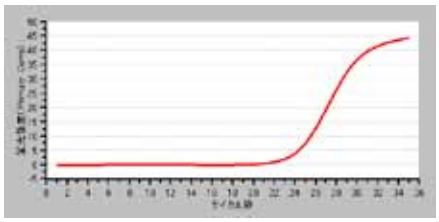
リアルタイム PCR 装置付属のソフトウェアで解析パラメーターを設定し Ct 値および Tm 値を算出します。
（操作方法の詳細は、Thermal Cycler Dice® Real Time System 取扱説明書および QuickPrimer (Real Time) シリーズ説明書をご参照ください。）

（1）解析パラメーターの設定

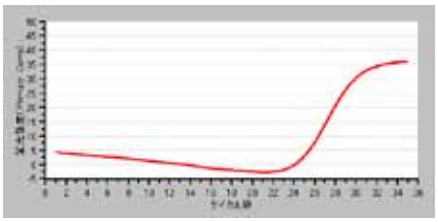
QuickPrimer (Real Time) シリーズでは、解析タイプとして絶対定量 Single を選択します。解析パラメーターが自動で設定されますが、まずその設定が正しいことを確認し、適切でない場合にはマニュアルで設定しなおしてください。
（絶対定量は、本来は目的遺伝子の絶対数を測定する目的で使用しますが、QuickPrimer シリーズでは、定性検出目的で使用します。）

<u>ベースライン領域</u>

増幅曲線が立ち上がる手前のフラットな範囲をベースライン領域として設定します。ベースライン領域が狭すぎる場合、十分なベースライン補正がなされません。逆に、ベースライン補正が広すぎると右下がりの増幅曲線になるなど、正しく補正されないことがあります。



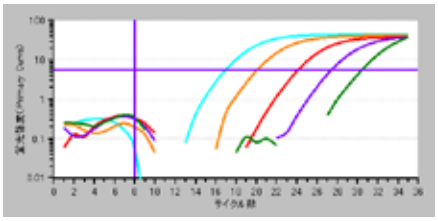
正しくベースラインが設定された例



ベースライン領域が広すぎる例

閾値

PCR の指数関数的増幅域に設定します。増幅曲線の縦軸を対数（Log scale）表示した際に増幅曲線が直線になる範囲が指数関数的増幅域に相当します。



正しく閾値が設定された例

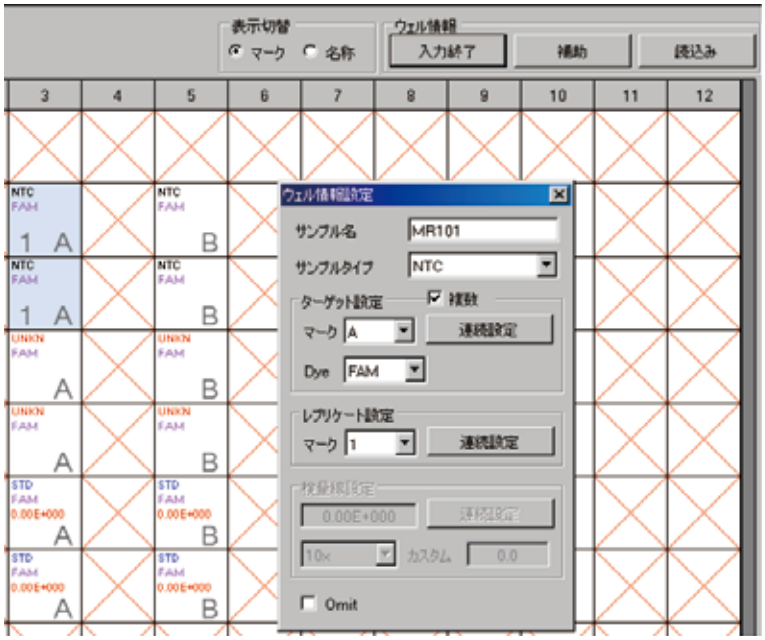
（2）Ct 値および Tm 値の算出

Ct 値および Tm 値はリアルタイム PCR 解析ソフトにより自動算出されます。

（3）データの出力

画面ごとに、次のデータ項目を選びます。（選択項目が異なると正しく判定できませんので、ご注意ください。）

1）「サンプル設定」画面において必要な入力情報



1. サンプル名：任意（サンプル名などを入力する。）
2. サンプルタイプ：必須

サンプルの反応ウェル　→ ＜ UNKN ＞
陽性コントロール DNA の反応ウェル　→ ＜ STD ＞＊
陰性コントロールの反応ウェル　→ ＜ NTC ＞

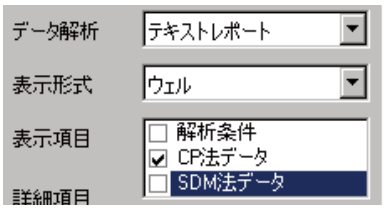
＊：STD 設定の際の濃度の入力は必要ありません。

＊：QuickPrimer 結果判定用エクセルシートにデータを正しくトランスポートするためには、上記 3 種類のサンプルタイプのすべてが設定されている必要があります。サンプルタイプの入力が上記設定と異なっている場合は、画面右上のウェル情報「入力」ボタンをクリックし、「ウェル情報設定」を表示させ、入力し直してください。

3. ターゲット設定：☑ 複数　必須
   ＊ 複数に☑を入れ、使用する QuickPrimer (Real Time) の種類ごとにマークを設定してください。＜連続設定＞を使用すると、設定が簡単に行えます。
   ＊ 1 種類しか反応を行わない場合でも、マークの設定が必要です。
4. Dye：＜ FAM ＞
5. レプリケート設定：n ＝ 2 以上で反応する場合は必須、n ＝ 1 の場合は任意
6. Omit：必須
   ＊反応に使用していないウェルは、Omit 設定を行ってください。

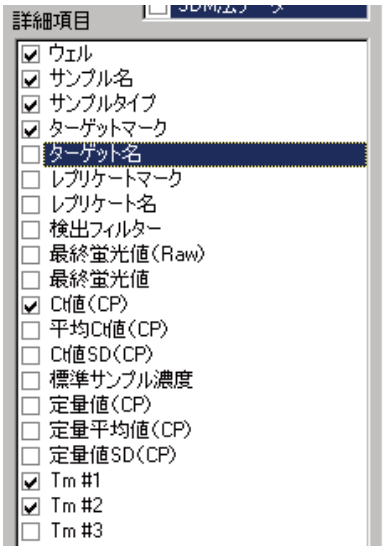
2)「結果 / 解析」画面において必要な入力情報
画面左上「検出フィルター」ボタンの“FAM”を選択し、画面右に表示された“データ解析”のプルダウンメニューより＜テキストレポート＞を選択する。判定に必要な項目を選択してください。

1. 表示形式：ウェル
2. 表示項目：＜☑ CP 法データ＞
   ＊ ＜☑ SDM 法データ＞の☑を外し、＜☑ CP 法データ＞のみに設定変更してください。



3. 詳細項目：☑ウェル
   ☑ サンプル名
   ☑ サンプルタイプ
   ☑ ターゲットマーク
   ☑ Ct 値（CP）
   ☑ Tm#1
   ☑ Tm#2

   ＊ 上記 7 種類以外の項目を☑に設定している場合は、QuickPrimer 結果判定用エクセルシートにデータが正しくトランスポートされませんのでご注意ください。



3) 出力
カーソルをテキストレポート画面上に置き右クリックによりデータ出力を選択し、Microsoft® Office Excel® または CSV のいずれかの形式で出力します。

（注）QuickPrimer 結果判定用エクセルシートは、3) で出力したテキストレポート結果を読み込みますが、ご利用の Excel バージョンにより読み込めない場合があります。下記をご参照の上、バージョンがご不明な場合には CSV 形式で出力ください。

＊ Excel 2007 の場合 :
xls, xlsx, csv いずれの拡張子も読み込み可能です。
＊ Excel 2003 の場合：
xls, xlsx, csv いずれも読み込み用選択肢として表示されますが、xlsx は正しく読み込めません。

II. QuickPrimer 結果判定用エクセルシートへの読み込みと結果の解析

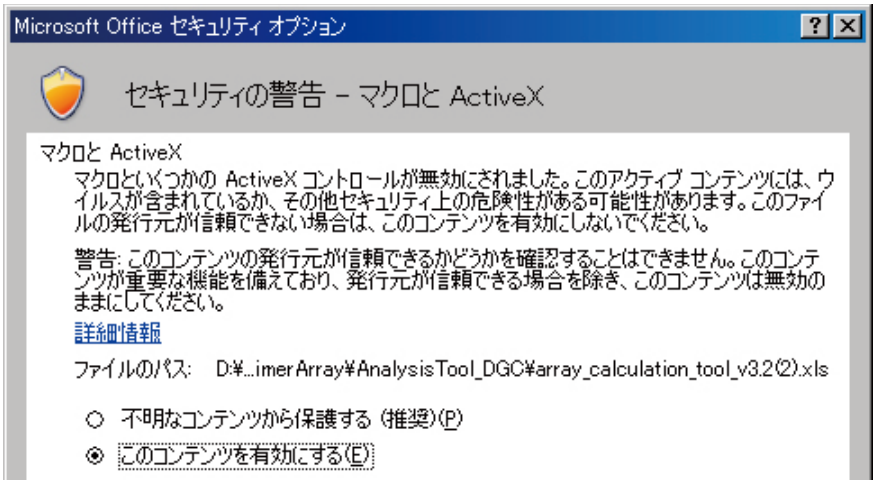
QuickPrimer 結果判定用エクセルシートにテキストレポートを読み込み、結果を自動判定します。

（1）QuickPrimer Tool Ver.1.0 の起動

QuickPrimer Tool Ver.1.0 ファイル（QuickPrimer Tool Ver.1.0.xls）を開きます。

QuickPrimer Tool Ver.1.0 ファイル（QuickPrimer Tool Ver.1.0.xls）はマクロを含んでいるため、セキュリティの警告が表示される場合があります。その場合にはマクロを有効にする操作を行ってください。

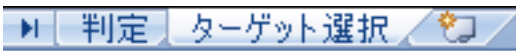
画面上のセキュリティの警告の " オプション " をクリックします。



「セキュリティの警告―マクロ」画面 の " このコンテンツを有効にする " を選択し、OK ボタンをクリックします。

（2）ターゲットの選択

QuickPrimer Tool Ver.1.0 ファイル（QuickPrimer Tool Ver.1.0.xls）は、「判定」、「ターゲット選択」の 2 枚のシートで構成されています。



まず、「ターゲット選択」シートを選択してください。

「ターゲット選択」シートの一番左 " ターゲットマーク " を、プルダウンメニューより選択します。Thermal Cycler Dice® Real Time System での解析時において Primer ごとに設定したターゲットマークと同じになるように選択してください。（上述 I-(3)-1)-3. を参照）
反応を行っていない Primer のターゲットマークは、空欄のままにします。誤って選択をした時は「Delete」キーで削除できます。

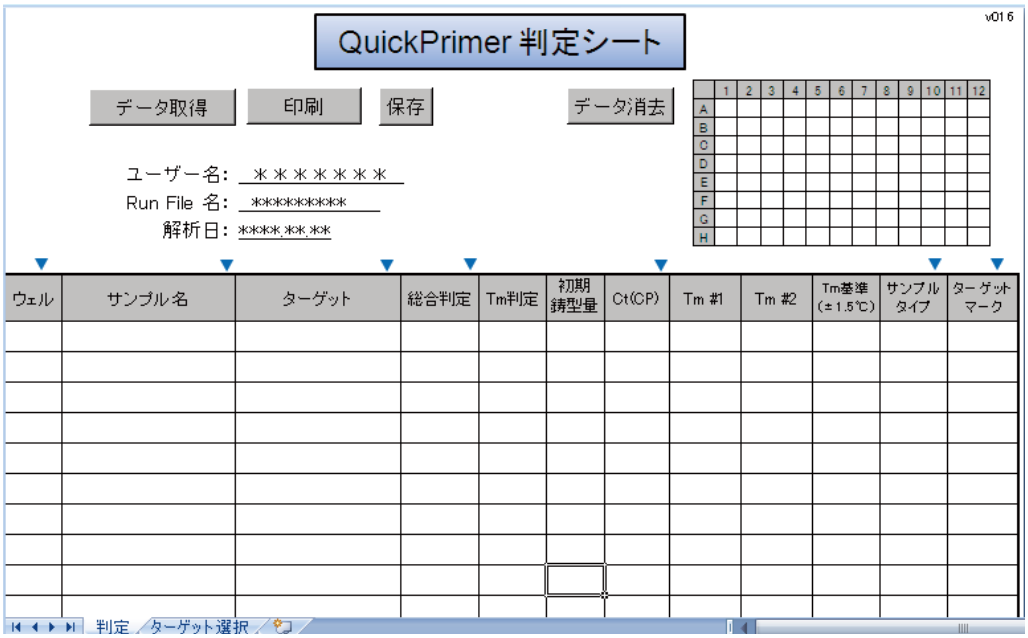
病原因子遺伝子検出用

ターゲットマーク	製品コード	製品名	Tm基準値（±1.5℃）	ターゲット
A	MR101	QuickPrimer InvE 遺伝子		InvE 遺伝子
	MR102	QuickPrimer IpaB 遺伝子		IpaB 遺伝子
	MR103	QuickPrimer IpaH 遺伝子		IpaH 遺伝子
B	MR104	QuickPrimer Shiga I 遺伝子		Shiga I 遺伝子
	MR105	QuickPrimer Shiga II 遺伝子		Shiga II 遺伝子
	MR106	QuickPrimer LT 遺伝子		LT 遺伝子
	MR107	QuickPrimer STI 遺伝子		STI 遺伝子
	MR109	QuickPrimer Tdh 遺伝子		Tdh 遺伝子
	MR110	QuickPrimer CdtA 遺伝子		CdtA 遺伝子

A
B
C
D
E
F
G
H

(3) データの入力

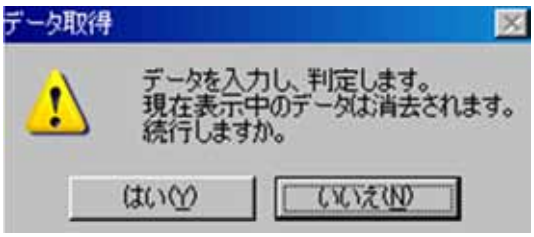
次に「判定」シートを選択し、「QuickPrimer 判定シート」画面にきりかえてください。



画面左上、「データ取得」ボタンをクリックし、メッセージに従い解析を行います。

1. 表示データの消去確認

現在画面に表示されているデータに対して、消去確認のメッセージが表示されます。



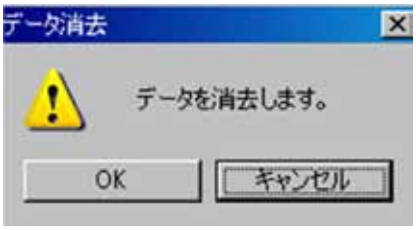
OK の場合は「はい」を選択、No の場合は「いいえ」を選択し解析結果を別名で保存してください。

2. ターゲット選択済みの確認

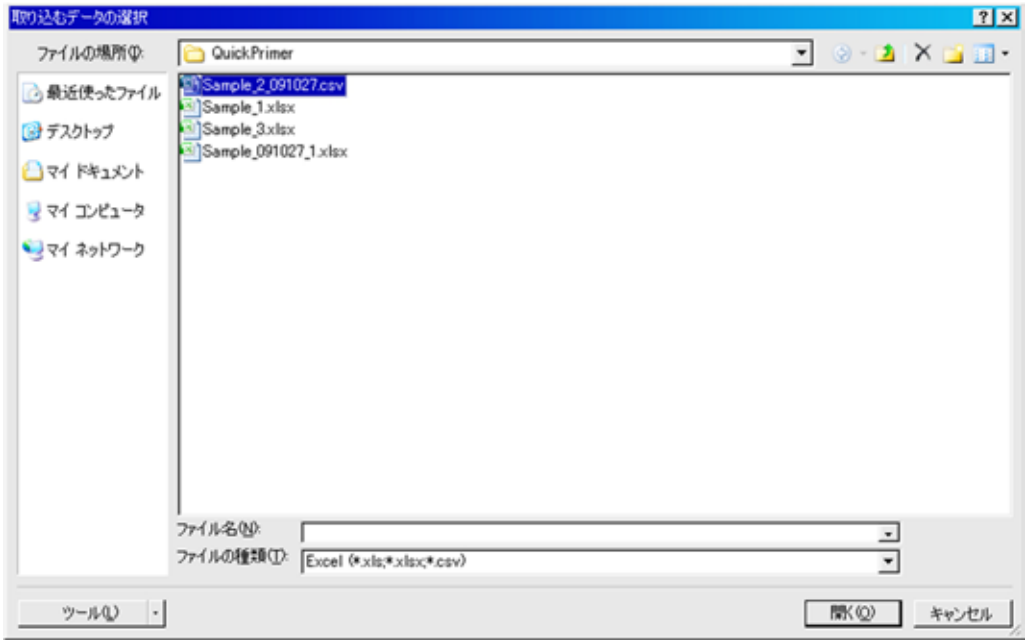
II-(2) において、「ターゲット選択」シート上で、ターゲットマークの選択作業が完了しているかを　問い合わせてきます。

「ターゲット選択」シート上で、正しくターゲットマークの選択ができていない場合は、正しくデータを取り込む事ができません。
忘れずに、II-(2) の作業を先に実施してください。

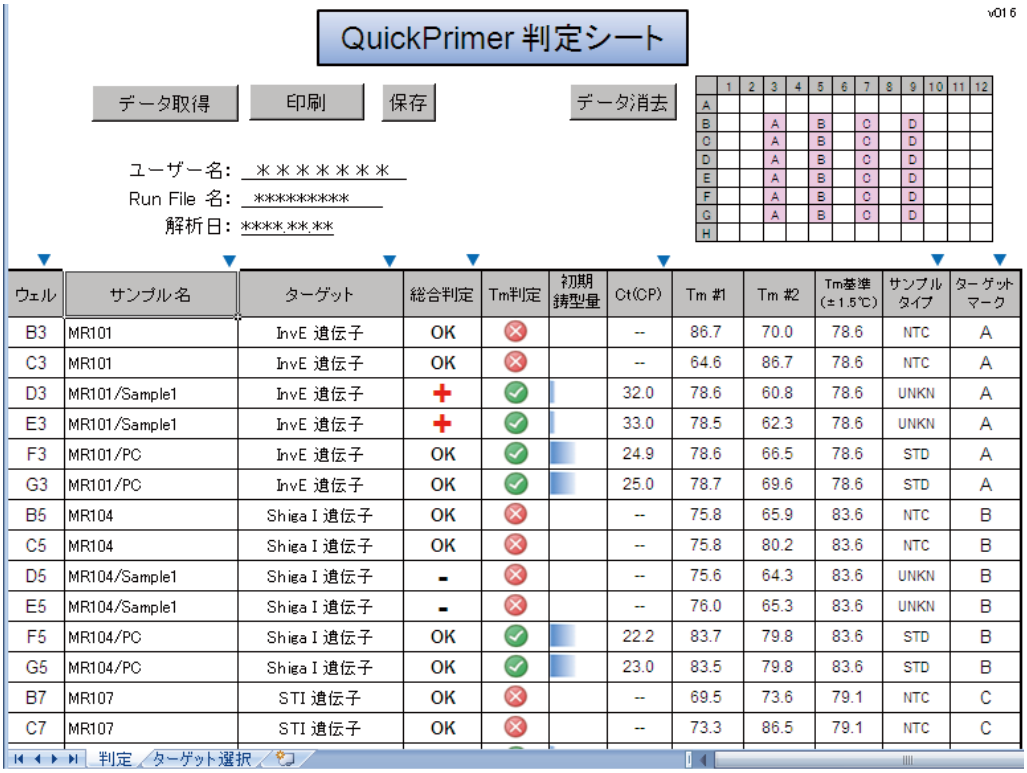
3. データ消去
   データ消去を確認してきますので、OK をクリックしてください。



4. データの選択
   取り込みデータの選択画面が表示されます。
   解析したいテキストレポートを選択し、画面右下に表示される「開く」ボタンをクリックします。



5. 結果の表示
   テキストレポートが自動的に取りこまれ、結果が表示されます。

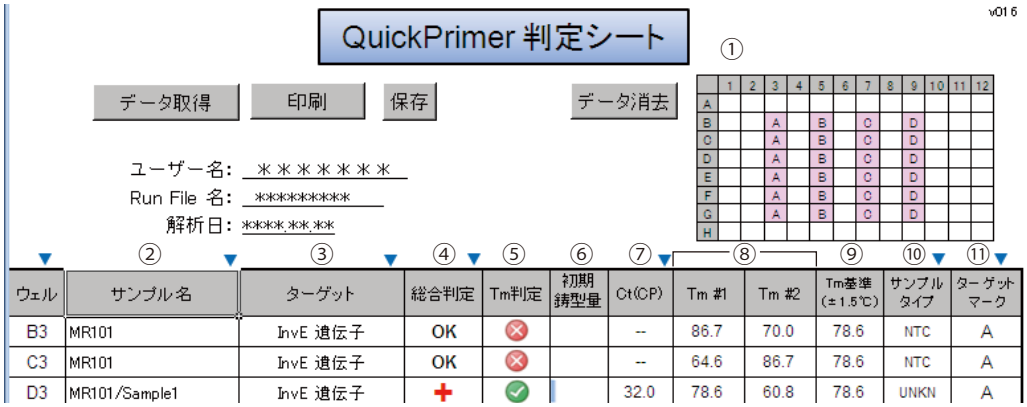


ウェル	サンプル名	ターゲット	総合判定	Tm判定	初期鋳型量	Ct(CP)	Tm #1	Tm #2	Tm基準(±1.5℃)	サンプルタイプ	ターゲットマーク
B3	MR101	InvE 遺伝子	OK	✗		--	86.7	70.0	78.6	NTC	A
C3	MR101	InvE 遺伝子	OK	✗		--	64.6	86.7	78.6	NTC	A
D3	MR101/Sample1	InvE 遺伝子	+	✓		32.0	78.6	60.8	78.6	UNKN	A
E3	MR101/Sample1	InvE 遺伝子	+	✓		33.0	78.5	62.3	78.6	UNKN	A
F3	MR101/PC	InvE 遺伝子	OK	✓		24.9	78.6	66.5	78.6	STD	A
G3	MR101/PC	InvE 遺伝子	OK	✓		25.0	78.7	69.6	78.6	STD	A
B5	MR104	Shiga I 遺伝子	OK	✗		--	75.8	65.9	83.6	NTC	B
C5	MR104	Shiga I 遺伝子	OK	✗		--	75.8	80.2	83.6	NTC	B
D5	MR104/Sample1	Shiga I 遺伝子	-	✗		--	75.6	64.3	83.6	UNKN	B
E5	MR104/Sample1	Shiga I 遺伝子	-	✗		--	76.0	65.3	83.6	UNKN	B
F5	MR104/PC	Shiga I 遺伝子	OK	✓		22.2	83.7	79.8	83.6	STD	B
G5	MR104/PC	Shiga I 遺伝子	OK	✓		23.0	83.5	79.8	83.6	STD	B
B7	MR107	STI 遺伝子	OK	✗		--	69.5	73.6	79.1	NTC	C
C7	MR107	STI 遺伝子	OK	✗		--	73.3	86.5	79.1	NTC	C

＊ ユーザー名、Run File 名、解析日を必要に応じて入力してください。
解析結果の表示は、▼をクリックすることで昇順にソートできます。

III. 判定

判定結果表（総合判定と参考値）の見方



1. 反応ウェル
   Thermal Cycler Dice® Real Time System で反応チューブをセットしたウェル位置をターゲットマークで表示します。

2. サンプル名
   Thermal Cycler Dice® Real Time System で設定したサンプル名を表示します。

3. ターゲット
   「ターゲット選択」シートのターゲットマークにおいて設定したマークに相当するターゲット名が自動表示されます。Thermal Cycler Dice® Real Time System で実際に反応させたターゲット名と、3. に表示されたターゲット名が同じであることを確認してください。

   注意：「ターゲット選択」シートにおいて、Thermal Cycler Dice® Real Time System で設定したターゲットマークと異なったマークを設定すると、3. のターゲット名が実際と異なった表示となりますのでご注意ください。

4. 総合判定
   ・陽性コントロール DNA 反応（10. サンプルタイプ＝ STD）の場合
   “OK” または “OUT” のいずれかを表示

   “OK”：Ct 値が 35 以下であり、Tm 基準± 1.5℃の範囲内に Tm#1、Tm#2 のいずれかが含まれている時

   測定の結果得られた Tm 値が、QuickPrimer Control DNA のデータシートに記載された参考 Tm 値と比較して大きく異なっていても、この条件を満たしていれば “OK” となりますのでご注意ください。

   ・陰性コントロール DNA 反応（10. サンプルタイプ＝ NTC）の場合
   “OK” または “OUT” のいずれかを表示

   “OK”：Ct 値が “ － ”、あるいは、35 以下の値が表示されていても Tm 基準± 1.5℃の範囲内に Tm 値が含まれない。

・サンプル反応（10. サンプルタイプ＝ UNKN）の場合
“＋”または“－”のいずれかを表示

“＋”：次の両条件を満たす時、“＋”と表示します。
（1） Ct 値が 35 以下である。
（2） 得られた Tm 値（Tm#1 または Tm#2）が Tm 基準値± 1.5℃（判定 Tm 基準値）に含まれる。

5. Tm 判定
：Tm#1、Tm#2 のいずれも判定基準 Tm 値に含まれない。
：Tm#1、Tm#2 のいずれかが、判定基準 Tm 値に含まれる。

6. 初期鋳型量
サンプルを増幅した際に得られた Ct（CP）値に応じて、3 段階の棒グラフを表示します。
Ct（CP）≦ 15
15 ＜ Ct（CP）≦ 30
Ct（CP）＞ 30

＊ Ct 値が 15 以下の場合は、反応系へのサンプル持ちこみ量が多すぎる場合があります。融解曲線パターンを確認し、必要に応じてサンプルを希釈する等の方法を実施してください。
＊ 使用する QuickPrimer の種類、サンプル中の PCR 阻害物質の混入量の差により PCR 増幅効率が異なり、Ct 値が同じであっても同じ初期鋳型量を示さない場合があります。

7. Ct（CP）
Thermal Cycler Dice® Real Time System で得られた実測値を表示します。
“--”：Ct 値が得られなかった場合

8. Tm#1、Tm#2
Thermal Cycler Dice® Real Time System で得られた実測値を表示します。

9. Tm 基準（± 1.5℃）
ターゲットごとに設定した陽性コントロール DNA（10 倍希釈液）（10. サンプルタイプ＝ STD）で得られた Tm#1 の値が、Tm 基準値として 9. の欄に反映します。
Tm 基準値± 1.5℃を判定基準 Tm 値とし、この範囲に含まれるかどうかにより 5. Tm 判定を行います。

STD を n ＝ 2 以上で反応した場合は、Tm#1 の平均値を Tm 基準値として算出し、平均値を表示します。

＜注意＞
9. で表示された Tm 基準値が、下記の参考 Tm 値付近の値であることを確認してください。

製品コード	参考 Tm 値	製品コード	参考 Tm 値
MR101	78.5	MR201	87.7
MR102	79.6	MR202	87.2
MR103	85.3	MR203	87.9
MR104	83.8	MR204	87.7
MR105	85.7	MR205	78.9
MR106	82.5	MR207	87.6
MR107	78.9	MR208	83.7
MR109	81.4		
MR110	81.8		
MR111	86.2		
MR112	77.5		
MR113	81.0		

参考 Tm 値一覧
（QuickPrimer Control DNA の各データシート記載の Tm 値）

10. サンプルタイプ
Thermal Cycler Dice® Real Time System で設定したサンプルタイプを表示します。

11. ターゲットマーク
Thermal Cycler Dice® Real Time System で設定したターゲットマークを表示します。「ターゲット選択」シートのターゲットマークに設定したマークと同じであることを確認してください。

Ⅳ．判定上の注意

1）コントロール反応おいて、判定シート 4. 総合判定に “OUT” の表示がある場合は、試薬調製に問題がありますので、再反応を行ってください。

2）本計算ソフトでは、陽性コントロール DNA（10 倍希釈液）の測定に誤りがあり、測定結果として間違った Tm#1 が得られた場合でも、得られた Tm#1 を自動的に Tm 基準値とし、サンプルの結果判定に使用します。
陽性コントロール DNA（10 倍希釈液）測定の結果得られた Tm 値が、参考 Tm 値付近の値であることを確認してください。（III-9 を参照）

3）本計算ソフトでは、STD を複数（n ＝ 2 以上）測定した場合、得られた個々の Tm 値のなかに、QuickPrimer Control DNA のデータシートに記載された参考 Tm 値に比べ大きく異なる Tm 値が含まれていても、それらすべての値を用いて自動的に平均値を算出し、これを Tm 基準値として採用します。参考 Tm 値に比べ大きく異なる Tm 値が含まれる場合には、正しい Tm 基準値が算出されず誤判定の原因になることがあります。

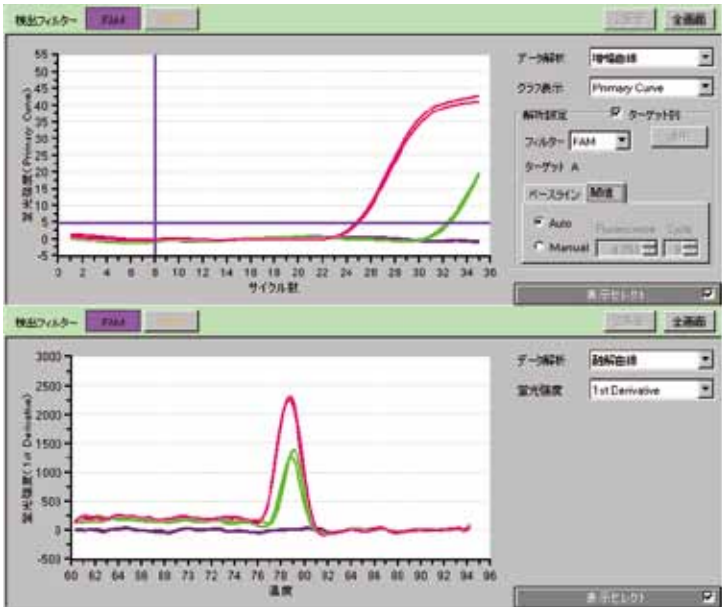
4）サンプル測定の結果を陽性と判定するためには、以下の（1）～（3）を満たしていることが必要です。

（1） 増幅曲線により得られた Ct 値が 35 より小さい。
（2） 融解曲線のパターンが陽性コントロール DNA を用いた場合と同じパターンを示す。
（3） 融解曲線分析により得られた Tm 値が判定基準 Tm 値に含まれる。

QuickPrimer 結果判定用エクセルシート（Thermal Cycler Dice® Real Time System 専用）で得られた結果からは、判定基準のうち（2）を確認することができません。
最終的な判定の際には、必ず Thermal Cycler Dice® Real Time System の “ 結果 / 解析 ” 画面より、陽性コントロール DNA（10 倍希釈液）、陰性コントロールの増幅曲線ならびに融解曲線で正しく反応が行われていることを確認したうえで、サンプルの増幅曲線と融解曲線の波形を比較確認してください。詳しくは、製品取扱説明書をご参照ください。

＜波形パターンの確認方法＞

1. Thermal Cycler Dice® Real Time System 画面左端の “ 結果 / 解析 ” ボタンをクリックし、データ解析画面を表示させる。
   ＊ 画面右上の「2 画面」ボタンをクリックすると上下 2 画面の解析結果を表示することができます。
2. 画面左上「検出フィルター」ボタンの “FAM” を選択し、画面右に表示された “ データ解析 ” のプルダウンメニューより＜融解曲線＞を選択する。
3. 右下の「表示セレクト」で表示するウェルを選択し、陽性コントロール DNA、陰性コントロール、サンプルの増幅曲線、融解曲線の波形を確認する。
   ＊ Ctrl キーを押しながらウェルを選択すると、表示された結果の上に別のウェルの結果を重ねて表示できます。
   ＊ 数種類のプライマーを利用した場合は、反応プライマーごとに陽性コントロール DNA とサンプルの Tm 値を比較することができます。



画面上；増幅曲線
画面下；融解曲線

赤：陽性コントロール DNA（S）
紫：陰性コントロール（N）
黄緑：サンプル（U）

V. トラブルシューティング

（1）QuickPrimer 結果判定用エクセルシートに、Thermal Cycler Dice® Real Time System から得られたテキストレポートをうまく読み込めない。

○ テキストレポートに出力した情報に過不足があると、正しく読み込むことができません。
テキストレポートに出力されている情報が、A 列から順に、ウェル、サンプル名、サンプルタイプ、ターゲットマーク、Ct 値（CP）、Tm#1、Tm#2 の 7 種類が表示されているかを確認してください。

	A	B	C	D	E	F	G
1	ウェル	サンプル名	サンプルタイプ	ターゲットマーク	Ct値(CP)	Tm #1	Tm #2
2	B3	MR101	NTC	A	--	86.7	70.0
3	C3	MR101	NTC	A	--	64.6	86.7
4	D3	MR101/Sample1	UNKN	A	31.99	78.63	60.78

（2）QuickPrimer 結果判定用エクセルシートにテキストレポートを読み込んだが、総合判定シートのカラムに何も表示されないものがある。

○ QuickPrimer Tool Ver.1.0 ファイル（QuickPrimer Tool Ver.1.0.xls）の「ターゲット選択」シートにおいてターゲットマークを選択していないターゲットについては、自動計算結果が表示されません。計算させたいターゲットすべてに、ターゲットマークが設定されていることを再度確認してください。

○「ターゲット選択」シートにおいて設定したターゲットマークと、Thermal Cycler Dice® Real Time System で測定の際に設定したターゲットマークが一致しているかどうかを、再度確認してください。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201003